

血红蛋白的结构分析*

曾溢滔 黄淑帧

(上海市儿童医院医学遗传研究室)

全世界迄今发现的异常血红蛋白达 270 多种^[1], 化学结构分析证明大多数属于肽链上的单个氨基酸替代^[2]; 国内也发现多种异常血红蛋白^[3], 但尚未作化学结构分析。本文介绍应用指纹法 (fingerprinting) 和肽段氨基酸层析法对国内发现的一种异常血红蛋白进行化学结构分析, 证明它是血红蛋白 S (HbS)。

指 纹 法

指纹法是指血红蛋白酶解产物的高压电泳—层析双向分离技术。此法由 Ingram^[4] 建立, 本文按 Ingram 法稍作修改。

血红蛋白的纯化: 应用淀粉板电泳技术^[5]分别从 HbS 病患者和健康成人的溶血液中提纯 HbS 和 HbA。

血红蛋白的酶解: 配成 2% 的纯 Hb 溶液 4 毫升, 用 0.2N NaOH 准确调 pH 至 8.0。在 90℃ 水浴中加热 4 分钟, 迅即冷却, 分别加入 0.45 毫升 pH 8.1 的 0.5M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-HCl}$ 缓冲液和 1.6 毫克的胰蛋白酶(二次结晶), 摇匀后置 38℃ 水浴箱中酶解 45 小时。酶解液以 4000 转/分离心 30 分钟, 取上清液置冰箱中保存待用。

酶解产物的指纹分析: 1. 高压电泳——国产新华三号滤纸裁成 60 × 25 厘米大小, 在距侧边 15 厘米, 底边 2.5 厘米处点入酶解液 20 微升, 用压板式高压电泳仪电泳, 缓冲液为吡啶: 冰醋酸: 水 = 100:4:900(V/V), 电压 2800V, 电泳 2 小时, 电泳结束后滤纸悬挂鼓风干燥箱中, 65℃ 吹干; 2. 层析和显色——经上述处理的滤纸进行垂直于电泳方向的上行层析。溶剂系统为吡啶: 异戊醇: 水 = 35:35:30。平衡 1 小时, 20℃ 展层 10 小时, 迅即鼓风烘干。用 0.5% 茚三酮的丙酮溶液染色。

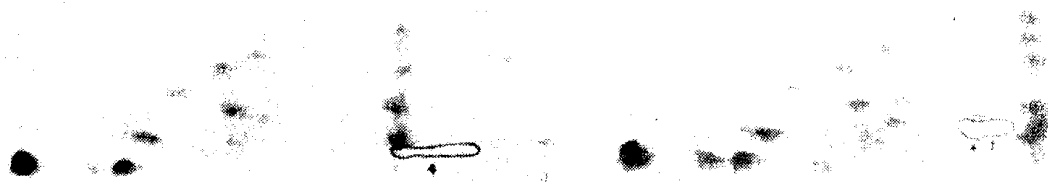


图 1 血红蛋白的酶解图谱

(箭头指示的是 4 号肽)

a. HbA 指纹图; b. HbS 指纹图

本文 1978 年 5 月 25 日收到。

* 本工作是在复旦大学遗传学研究所协作下完成。

结果: HbA 和 HbS 的酶解图谱表示于图 1. 每个样本均重复分析 50 次以上, 得到相同的结果。

从图 1 可以看出, HbS 有一个肽斑(按国际命名为 4 号肽)的位置与 HbA 不同, 即出现明显的向左上方位移。

肽段氨基酸分析

通过肽段的氨基酸分析进一步鉴定 HbA 正常 4 号肽的氨基酸组成和 HbS 异常 4 号肽的氨基酸变异。

肽段的水解: 从上述得到的酶解图谱中分别剪下 HbA 和 HbS 的 4 号肽各 5 片, 剪成 0.5×3 毫米的碎纸条, 加入 2.5 毫升的重蒸恒沸点盐酸, 捣成糊状, 置玻璃砂芯漏斗上减压过滤, 滤液放入安瓿瓶内, 用油泵抽真空后随即封口, 置 110°C 烘箱内水介 20 小时, 水解液置蒸发皿内, 于沸水浴上加热蒸发, 除尽盐酸, 放干燥器内保存待用。

双向纸层析: 把新华 1 号滤纸裁成 25×25 厘米, 上述的肽段水解物用二滴 10% 异丙醇溶解, 在滤纸距二边各 2.5 厘米处点样, 作双向上行层析。溶剂系统是: 第一向——正丁醇: 80% 甲酸: 水 = 15:3:2; 第二向——正丁醇: 吡啶: 60% 酒精: 水 = 5:1:1:1。平衡 1 小时, 20°C 展层 9 小时, 80°C 烘干后茚三酮或吲哚醌显色。

结果: HbA 正常的 4 号肽和 HbS 异常的 4 号肽的氨基酸层析图谱表示于图 2 中。氨基酸含量测定^[6]结果表明, HbA 4 号肽的氨基酸组分符合缬:组:亮:苏:脯:谷:赖 = 1:1:1:1:1:2:1 (图 2-a), 与标准值一致^[7]。HbS 异常 4 号肽的氨基酸组分变为缬:组:亮:苏:脯:谷:赖 = 2:1:1:1:1:1:1 (图 2-b)。

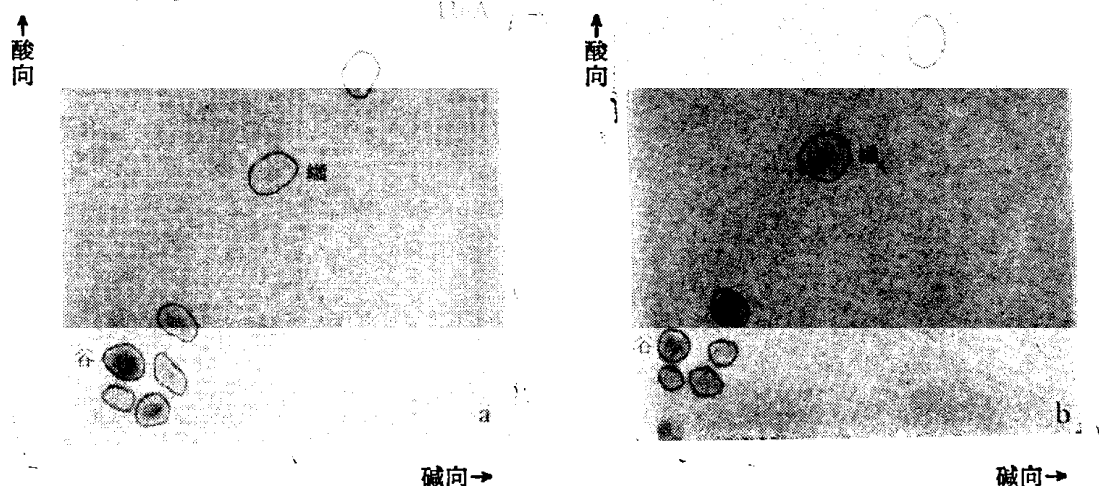


图 2 血红蛋白 4 号肽的氨基酸层析图

a. HbA4 号肽; b. HbS4 号肽

讨 论

血红蛋白分子由 4 条肽链, 即 2 条 α 链和 2 条 β 链构成, 表示为 $\alpha_2\beta_2$ 。 α 链由 141 个氨基酸构成, β 链由 146 个氨基酸构成。应用胰蛋白酶专一地把血红蛋白的肽链切割成 30 多个肽段, 再通过高压电泳—层析双向分离(指纹法)可以鉴定出异常血红蛋白变异的肽段。Ingram^[4]应用这种技术发现镰刀状细胞贫血症(sickle cell anemia)病人异常血红蛋白(HbS)的结构变

化,发生在酶解图谱的4号肽上。这个肽段共有8个氨基酸,即 β 链N末端的第1—8位的氨基酸,排列顺序为缬-组-亮-苏-脯-谷-谷-赖。Ingram^[7]证明4号肽的异常为第6位的谷氨酸替代为缬氨酸。

本文患者异常血红蛋白的结构分析结果证明其4号肽的异常表现为一个谷氨酸被缬氨酸替代,与国外文献^[7]相符。结合患者红细胞在脱氧条件下变成镰刀状,有贫血史等特征^[8],证实本文患者的异常血红蛋白是HbS。

致谢:中国科学院生物化学研究所忻纪厚同志提供胰蛋白酶,上海市第一人民医院梁瑞君医生提供HbS病患者血样,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Garver, F. A. et al., *Science*, 196(1977), 1334.
- [2] 三轮史郎和田攻,异常血色素症,“血液疾患”3A,中尾喜久编,中山书店,1975,88—92.
- [3] 曾溢滔, *Scientia Sinica* 18 (1975), 527.
- [4] Ingram, V. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 28(1958), 539.
- [5] 曾溢滔等,上海医学,1979,2:58.
- [6] 潘家秀等,蛋白质化学研究技术,科学出版社,1973,34—63.
- [7] Ingram, V. M., *Hemoglobin and Its Abnormalities*, Charles C Thomas, Springfield, 1961, 92.
- [8] 曾溢滔等,遗传学报,6 (1979), 116.